

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 4 月 19 日 (19.04.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/26694 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 48/00. (74) 代理人: 浅村 皓. 外(ASAMURA, Kiyoshi et al.): 〒100-0004 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06947
- (22) 国際出願日: 2000 年 10 月 5 日 (05.10.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/288532 1999 年 10 月 8 日 (08.10.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): メドジェン バイオサイエンス株式会社 (MEDGENE BIOSCIENCE, INC.) [JP/JP]: 〒560-0085 大阪府豊中市上新田1丁目24番C-1101号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森下 竜一 (MORISHITA, Ryuichi) [JP/JP]: 〒532-0003 大阪府大阪市淀川区宮原2-11-22-502 Osaka (JP). 谷山 義明 (TANIYAMA, Yoshiaki) [JP/JP]: 〒567-0048 大阪府茨木市北春日丘4-11-38 グランドール山口302 Osaka (JP). 荻原 俊男 (OGIHARA, Toshio) [JP/JP]: 〒562-0046 大阪府箕面市桜ヶ丘2-7-29 Osaka (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE THERAPY FOR CARDIOMYOPATHY

(54) 発明の名称: 心筋症遺伝子治療

(57) Abstract: Noninvasive administration of HGF gene in the form of Sendai virus (HVJ)-liposome into injured myocardium under echography makes it possible to promote angiogenesis and inhibit fibrosis in the myocardial layer, thereby restoring heart functions.

(57) 要約:

損傷を受けた心筋内に、センダイ・ウイルス (HVJ) - リポソームの形態にある HGF 遺伝子を、エコー使用下、非侵襲的に投与することにより、心筋層の血管新生の促進と線維化抑制を図り、心機能を回復させることができる。

WO 01/26694 A1



明 細 書

心筋症遺伝子治療

技術分野

- 5 本発明は、HGF遺伝子を非侵襲的に投与して心筋障害を治療する遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤に関する。具体的には、HGF遺伝子を心筋内に非侵襲的に投与することからなる心筋障害遺伝子治療法、特に、エコー使用下でHGF遺伝子を障害心筋部位に注入し、より効率的に心筋症等の心疾患又は狭心症、心不全を治療する心筋障害遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤に関する。更に、
- 10 HGF遺伝子以外の他の遺伝子にも適用可能な遺伝子治療法であって、エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に遺伝子を投与することからなる遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤に関する。

背景技術

- 近年のめざましい医療技術の向上に関わらず循環器領域においては、未だ多くの問題が未解決であり、その中の一つの重要な課題として、心筋障害の問題が挙げられる。
- 15

- 心筋障害とは心筋の器質的および機能的異常に起因する疾患の総称であり、例えば心筋症の場合、高血圧、代謝異常症、虚血等の基礎疾患に続発する二次性心筋症と、明らかな基礎疾患なしに発症する突発性心筋症（ICM）に分類される。
- 20 ICMのうち、遺伝子レベルでの病因解明が最も進んでいるのは肥大型心筋症（HCM）である。HCMでは患者の半数以上に常染色体性優性遺伝形式に従う明らかな家族歴が認められる。このような多発家系を対象とした連鎖解析が行われ、これまでに5つの原因遺伝子座が同定され、その内の4座では原因遺伝子自体が特定されている。
- 25 また、拡張型心筋症（DCM）の症例の多くは孤発例であるが、約20%には家族歴が認められる。このような多発家系を対象とした連鎖解析から、7つの原因遺伝子座（ただし原因遺伝子は不明）が特定されている。

しかしながら、心筋障害に関しては、このように原因遺伝子の特定と発症機構の解明についての研究が行われている状況であり、遺伝子治療に向けた具体的な

動きは現在まで行われていない。

一方で、最近の分子生物学の飛躍的向上により、遺伝子導入法による細胞機能の賦活化が可能となり、種々の取り組みがなされてきた。特に、心臓への遺伝子導入法については、静脈内注入法 (J. Clin. Invest., 90, 626-630 (1992))、直接注
5 入法 (Circulation, 82, 2217-2221 (1990)、Circulation, 90, 2414-2424 (1994)) 又は、プラスミドをそのまま用いる冠動脈内拡散注入法 (J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 109, 716-720 (1995)) 等の幾つかの報告があるものの、非侵襲的で具体的な治療法につながるものではなかった。

発明の開示

- 10 本発明は、これまで有効な治療法が見出されていなかった心筋障害の非侵襲的な治療法及びそれに用いる治療剤を提供することを目的とする。すなわち本発明は、HGF 遺伝子を非侵襲的に投与して心筋障害を治療する遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤を提供することを目的とする。具体的には、HGF 遺伝子を心筋内に非侵襲的に投与することからなる心筋障害遺伝子治療法、特に、エコー使
15 用下でHGF 遺伝子を障害心筋部位に注入し、より効率的に心筋症等の心疾患又は狭心症、心不全を治療する心筋障害遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤を提供することを目的とする。更に、HGF 遺伝子以外の他の遺伝子にも適用可能な遺伝子治療法であって、エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に遺伝子を投与することからなる遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤を提供することを目的と
20 する。

- 本発明者らは鋭意検討の結果、遺伝子としてHGF 遺伝子を使用し、非侵襲的に直接患部心筋層に注入することで有効な効果が得られることを見出した。すなわち本発明者らは、患部を切開あるいは開胸することなく、エコー使用下で視覚的に患部心筋層にHGF 遺伝子を注入することが効果的であることを見出した。
25 当該治療法は非侵襲的な治療法であるため、病状に応じて何回でも当該遺伝子を投与することが可能であり、従って効果的な心筋障害の治療を行うことができる。

このように、本発明者らはエコー使用下で視覚的に直接患部組織に遺伝子を投与することにより効果的な治療が行えることをはじめて見いだしたものであり、各種の臓器特異的な疾患の遺伝子治療が本発明方法で可能であることを明らかに

した。

例えば、HGF遺伝子を用いる場合、本発明の方法により、各種の臓器特異的な疾患、例えば肺線維症あるいは、肝硬変、肝線維症等の治療を行うことも可能である。更に、HGF遺伝子以外の他の遺伝子治療用の遺伝子も、前記本発明の

5 方法により効果的な治療を行なうことができる。

すなわち本発明の要旨は以下のとおりである。

(1) HGF遺伝子を有効成分として含有する、非侵襲的投与のための心筋障害治療剤、

(2) HGF遺伝子を心筋内に投与するための、上記(1)記載の治療剤、

10 (3) HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリボソームの形態にある、上記(1)又は(2)記載の治療剤、

(4) エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に投与するための、上記(2)又は(3)記載の治療剤、

(5) 少なくとも各週1回で8回投与するための、上記(1)～(4)のいずれ
15 か記載の治療剤、

(6) HGF遺伝子として少なくとも10 μ gを用いる、上記(1)～(5)のいずれか記載の治療剤、

(7) 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、上記(1)～(6)のいずれか記載の治療剤、

20 (8) 障害の治療に有効な遺伝子を有効成分として含有する、エコー使用下に障害組織部位に該遺伝子を非侵襲的に投与するための遺伝子治療剤、

(9) 組織障害部位が心筋である、上記(8)記載の治療剤、

(10) 遺伝子がHGF遺伝子である、上記(8)又は(9)記載の治療剤、

(11) HGF遺伝子を非侵襲的にヒトを含む哺乳動物の心筋内に投与すること
25 を含む、心筋障害の遺伝子治療法、

(12) HGF遺伝子がセンダイ・ウイルス(HVJ)ーリボソームの形態にある、上記(11)記載の治療法、

(13) HGF遺伝子を、エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に投与する、上記(11)又は(12)記載の治療法、

- (14) HGF 遺伝子を少なくとも各週 1 回で 8 回投与する、上記 (11) ~ (13) のいずれか記載の治療法、
- (15) 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、上記 (11) ~ (14) のいずれか記載の治療法、
- 5 (16) エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に障害の治療に有効な遺伝子を投与することを含む、遺伝子治療法、
- (17) 障害組織が心筋である、上記 (16) 記載の治療法、
- (18) 遺伝子が HGF 遺伝子である、上記 (16) 又は (17) 記載の治療法、
- (19) 非侵襲的投与用心筋障害治療剤の製造のための HGF 遺伝子の使用、
- 10 (20) HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス (HVJ) - リボソームの形態にある、上記 (19) 記載の使用、
- (21) エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に HGF 遺伝子を投与するための治療剤である、上記 (19) 又は (20) 記載の使用、
- (22) 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、上記 (19) ~ (21) のいずれか記載の使用、
- 15 (23) エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に障害の治療に有効な遺伝子を投与するための遺伝子治療剤製造のための遺伝子の使用、
- (24) 障害組織が心筋である、上記 (23) 記載の使用、
- (25) 遺伝子が HGF 遺伝子である、上記 (23) 又は (24) 記載の使用。
- 20 図面の簡単な説明

図 1 は、心筋症ハムスターの心臓に HVJ を用いてレポーター遺伝子であるルシフェラーゼを導入し、ルシフェラーゼ活性値が高値を示したことで、エコー使用下に遺伝子導入が可能であることが証明された結果を示すグラフである。

- 図 2 は、心臓における毛細血管密度を ALP 染色で測定し、HGF 遺伝子とコントロールを比較した結果を示すグラフである。
- 25

図 3 は、心臓の血流量をレーザー・ドップラー・イメージャー (LDI) スコアで評価し、HGF 遺伝子群とコントロール群、非処理群とを比較した結果を示すグラフである。

図 4 は、心筋における線維化の分布密度を Masson 染色で測定し、HGF 遺伝子

とコントロールを比較した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

- 本発明で使用されるHGF遺伝子とは、HGFを発現し得る遺伝子を言い、当該遺伝子には、発現されるポリペプチドがHGFと実質的に同効である限り、その遺伝子配列の一部が欠失又は他の塩基により置換されていたり、他の塩基配列が一部挿入されていたり、5'末端及び/又は3'末端に塩基が結合したような遺伝子も包含される。かかる遺伝子としては、例えば、Nature, 342, 440(1989)、特許第2777678号公報、Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967(1989)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 172, 321(1990)などに記載のHGF遺伝子が例示され、これらの遺伝子を本発明で使用する事が出来る。

- ここでHGF遺伝子(HGFをコードするcDNA)の塩基配列は、前記文献に記載されている他、Genbank等のデータベースにも登録されている。従ってこれらの配列情報に基づき適当なDNA部分をPCRのプライマーとして用い、例えば肝臓や白血球由来のmRNAに対してRT-PCR反応を行うことなどにより、HGFのcDNAをクローニングすることができる。これらのクローニングは、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に従い、当業者ならば容易に行うことができる。またHGF遺伝子の改変等も、前記基本書に従い当業者ならば容易に行うことができる。

- 次に、本発明の遺伝子治療において用いられる遺伝子導入方法、導入形態および導入量等について記述する。

- HGF遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別され、実験手引書などにその調製法、投与法が詳しく解説されている(別冊実験医学, 遺伝子治療の基礎技術, 羊土社, 1996、別冊実験医学, 遺伝子導入&発現解析実験法, 羊土社, 1997、日本遺伝子治療学会編遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティイー・エス, 1999)。以下、具体的に説明する。

A. 非ウイルスベクターを用いる場合

慣用の遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞や組織に導入すること

ができる。

細胞への遺伝子導入法としては、リボフェクション法、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法などが挙げられる。

- 5 また、組織への遺伝子導入法としては、内包型リポソーム (internal type liposome) による遺伝子導入法、静電気型リポソーム (electrostatic type liposome) による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法 (HVJ-AVEリポソーム法)、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクル銃で担体 (金属粒子) とともにDNA分子を細胞に移入する方法、naked-DNAの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等のいずれかの方法に供す
- 10 ることにより、組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。

- このうちHVJ-リポソームは、脂質二重膜で作られたリポソーム中にDNAを封入し、さらにこのリポソームと不活化したセンダイウイルス (Hemagglutinating virus of Japan : HVJ) とを融合させたものである。当
- 15 該HVJ-リポソーム法は従来のリポソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、好ましい導入形態である。HVJ-リポソームの調製法については文献 (実験医学別冊, 遺伝子治療の基礎技術, 羊土社, 1996、遺伝子導入&発現解析実験法, 羊土社, 1997、J. Clin. Invest. 93, 1458-1464 (1994)、Am. J. Physiol. 271, R1212-1220 (1996)) などに詳しく述べられているため、それらを参照されたい。またHVJリポソーム法とは、例えば
- 20 Molecular Medicine, 30, 1440-1448 (1993)、実験医学, 12, 1822-1826 (1994)、蛋白質・核酸・酵素, 42, 1806-1813 (1997) 等に記載の方法であり、好ましくは Circulation, 92 (Suppl. II), 479-482 (1995) に記載の方法が挙げられる。

- なおHVJとしてはZ株 (ATCCより入手可能) が好ましいが、基本的には他の
- 25 HVJ株 (例えば ATCC VR-907や ATCC VR-105など) も用いることができる。

さらに、naked-DNAの直接導入法は、上記手法のうち最も簡便な手法であり、この観点から好ましい導入法である。

ここで用いられる発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良いが、例えば

pCAGGS (Gene 108, 193-200(1991)) や、pBK-CMV、pCDNA3.1、pZeoSV (インビトロゲン社、ストラタジーン社) などの発現ベクターが挙げられる。

B. ウイルスベクターを用いる場合

- 5 ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス (HIV) 等のDNA
- 10 ウイルスまたはRNAウイルスに目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である

前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からは、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

- 15 本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する *in vivo* 法、及び、ヒトからある種の細胞を取り出して体外で遺伝子治療剤を該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法がある
- (日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、日本遺
- 20 伝子治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ディー・エス、1999)。本発明では、*in vivo* 法が好ましい。

- 製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態 (例えば液剤など) をとり得る。例えば有効成分である遺伝子を含有する注射剤とされた場合、当該注射剤は常法により調製することができ、例えば適切な溶剤 (PBS等の緩
- 25 衝液、生理食塩水、滅菌水等) に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。当該注射剤には必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リボソーム等のリボソームにおいては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤などのリボソーム製剤の形態とすることができる。

本発明で導入されるHGF遺伝子以外に、内因性の心筋保護因子や心筋細胞における再生因子を併用することが可能である。例えば、心筋細胞障害時に高度に発現されるTGF- β や熱ショック蛋白(HSP)等の因子は、心筋障害を軽減し心筋修復に関与することが報告されているため、これらの遺伝子を使用することもできる。又、EGF等の増殖因子は、組織の種々の細胞障害を修復することが報告されており、これらの遺伝子を用いることも可能である。更には、これらの心筋保護因子や再生因子以外にも、心筋保護や再生に関与する因子も用いることができる。

本発明では、このようにHGF遺伝子を単独にあるいは他の遺伝子と組み合わせ10 せて心臓の心筋細胞に導入し、高度に発現させて、損傷を受けた心筋細胞等に必要目的蛋白を供給することができる。そしてこれにより、損傷を受けた心筋細胞等の賦活化を図って心筋細胞等を修復再生させ、心筋障害に陥った心機能の回復正常化が出来ることになる。従って本発明の遺伝子治療剤は、重症の心筋症患者に適用が可能であり、心臓移植以外には治療の手段がない患者の救済も可能と15 なった。

さらに本発明の治療剤は、重症の心筋症患者だけでなく、進行中の軽度の心筋症患者にも使用することができる。また、狭心症や心不全等の心筋障害の患者にも使用することができる。

本発明の遺伝子治療剤は、治療目的の疾患、症状などに応じた適当な投与方法20 ・投与部位が選択される。投与部位としては、心筋内(障害心筋部位)への投与が好ましい。また投与方法としては、非経口的に投与することが好ましい。

非経口的な投与方法の好ましいものとして、例えば、非侵襲的なカテーテルあるいは非侵襲的な注射器等による投与方法を挙げることができる。更に好ましくは、エコー使用下での非侵襲的なカテーテルあるいは注射器等による投与方法を25 挙げることができる。非侵襲的なカテーテルを用いる投与方法としては、例えば、心筋内に直接HGF遺伝子を注入する方法が挙げられる。

本発明の治療剤の投与量としては、患者の症状等によって異なるが、HGF遺伝子として成人患者当たり0.0001mg~100mg、好ましくは0.001~10mg程度の投与量が挙げられる。

またH V Jーリボソームの形態をとる場合は、H G F 遺伝子として成人患者当たり約1～約4 0 0 0 μ g の範囲、好ましくは約1 0～約4 0 0 μ g の範囲から投与量が選択される。

本発明の治療剤は、数日ないし数週間に一回投与するのが好適であり、好ましくは各週1回の投与が挙げられる。

投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。治療目的に応じて複数回が好適であり、好ましくは8回投与することが挙げられる。

更に、本発明においては、エコー使用下に障害組織部位に障害の治療に有効な遺伝子を非侵襲的に投与することを含む、新規な遺伝子治療法及びそれに用いる治療剤も提供される。すなわち本発明においては、エコー使用下で視覚的に直接患部組織に遺伝子を投与することにより、効果的な治療が行なえることを初めて見出した。当該治療法では、遺伝子を非侵襲的に投与するため、病状に応じて何回でも所望の遺伝子を投与することが可能であるという、従来にない利点を有する。このような本発明の遺伝子治療法は、H G F 遺伝子に限らず、遺伝子治療用のあらゆる遺伝子に適用可能である。当該遺伝子治療法は、特に、障害心筋部位に対して適用された場合に効果的である。その際に投与される遺伝子としては、H G F 遺伝子やT G F - β 遺伝子、H S P 遺伝子、V E G F 遺伝子、F G F 遺伝子、E G F 遺伝子等が挙げられる。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実験材料及び方法

実験動物

心筋症ハムスター（B i o 1 4 . 6）はオリエンタル酵母から購入した。

H G F 遺伝子

ヒトH G F 遺伝子は、ヒトのH G F のc D N A（特許第2777678号）を常法によりクローニングし、これを発現ベクターp c D N A（インビトロゲン社製）に挿入したものをを用いた。

実験方法

1. エコー使用下に心筋症ハムスターの心臓にH V Jリボソームを用いてレポー

ター遺伝子であるルシフェラーゼを導入し、1週間後にその活性を調べた。コントロール群はPBSのみをエコー使用下に導入した。ルシフェラーゼ活性をルミノメーター (Lumat LB9507 (BERTHOLD社)) で測定した。

2. エコーカルシオグラム (MD 500, YOKOKAWA-GE) の操作下、
5 心筋症ハムスター (12週齢) の心臓の腹部側心筋にHVJ-リボソーム製剤を注入し、以下の1)～3)の検討を行った。

- 1) 心筋内の毛細血管密度をALP染色で測定し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較した。
2) HVJ-リボソーム製剤が投与された心臓の血流量を、レーザー・ドップラー・イメージャー (LDI) スコアで評価し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較した。
10 3) 心筋のMasson染色を行い、コンピュータ解析により線維化の分布密度を測定し、HGF遺伝子とコントロールの場合を比較した。

参照例 1

15 HVJ-リボソーム製剤の作製

- 10mgの乾燥脂質 (ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、コレステロールの1:4.8:2の混合物) と、HGF遺伝子 (100 μ g) -HMG 1 (high mobility group 1 nuclear protein, 25 μ g) を含有する等張液 (137 μ M NaCl, 5.4 μ M KCl, 10 μ M Tris-HCl; pH7.6) 200 μ lを混合し、激しく攪拌して超音波を掛けてリボソームを形成させた。精製センダイウイルス (Z株) を3分間
20 UV照射 (110erg/mm²/sec) した。リボソーム懸濁液とセンダイウイルス (HVJ) を混合して4 $^{\circ}$ C 10分間、続いて37 $^{\circ}$ C 30分間加温した。遊離のHVJを除去して、HVJ-リボソーム製剤を取得した。

参照例 2

25 ルシフェラーゼ活性の測定

ハムスター (1群6匹) にルシフェラーゼ遺伝子10 μ gのリボソーム製剤を投与し、1週間後にルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図1に示す。

図1に示されるとおり、心臓におけるルシフェラーゼは高値を示し、エコー使用下に遺伝子導入が可能であることが証明された。

実施例 1

心筋症ハムスターのHGF遺伝子による治療

1 2週齢の心筋症ハムスター（1群6匹）の心臓の腹部側心筋にリボソーム製剤を注入した。コントロール群としては、コントロールベクターの入ったリボソーム製剤を同様に12週齢の心筋症ハムスター（1群6匹）に注入した群を設け、
5 未処理群として無処置の心筋症ハムスター（1群6匹）を設けた。その後、各週にリボソーム製剤を計8回注入した。8週後、20週齢の心筋症ハムスターの心臓の心筋内の毛細血管密度をALP染色で測定し、血流量をLDIスコアで評価した。また、ハムスターを安楽死させた後、心臓を摘出しMasson染色後に、
10 コンピュータによる解析にて線維化の分布密度を測定した。

ALP染色により、HGF遺伝子治療群では顕著に血管新生による毛細管密度の上昇が見られた。この結果を図2に示す。

LDIスコアは、コントロール群を100%とすると、HGF遺伝子治療群では $163 \pm 7\%$ であり、顕著に血流量が増大していた。この結果を図3に示す。

15 Masson染色の解析では、HGF遺伝子治療群で顕著な線維化分布密度の減少が見られた。この結果を図4に示す。

産業上の利用可能性

本発明のHGF遺伝子を有効成分とする心筋障害治療剤は、患部心筋の血管新生を促し、患部の血流量を増大させると共に、心筋の線維化を抑制、軽減し、心
20 機能を回復させることができる。また本発明の治療剤は、エコー使用下視覚的に患部心筋層へ、非侵襲的にかつ的確に注入することができる。従ってこれらの効果により、本発明の治療剤は心筋障害をより効果的に治療することができるものである。

請求の範囲

1. 肝実質細胞増殖因子（HGF）遺伝子を有効成分として含有する、非侵襲的投与のための心筋障害治療剤。
- 5 2. HGF 遺伝子を心筋内に投与するための、請求項 1 記載の治療剤。
3. HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス（HVJ）ーリボソームの形態にある、請求項 1 又は 2 記載の治療剤。
4. エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に投与するための、請求項 2 又は 3 記載の治療剤。
- 10 5. 少なくとも各週 1 回で 8 回投与するための、請求項 1 ～ 4 のいずれか記載の治療剤。
6. HGF 遺伝子として少なくとも $10 \mu\text{g}$ を用いる、請求項 1 ～ 5 のいずれか記載の治療剤。
7. 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、請求項 1 ～ 6 のいずれか記載の治療剤。
- 15 8. 障害の治療に有効な遺伝子を有効成分として含有する、エコー使用下に障害組織部位に該遺伝子を非侵襲的に投与するための遺伝子治療剤。
9. 組織障害部位が心筋である、請求項 8 記載の治療剤。
10. 遺伝子が HGF 遺伝子である、請求項 8 又は 9 記載の治療剤。
- 20 11. HGF 遺伝子を非侵襲的にヒトを含む哺乳動物の心筋内に投与することを含む、心筋障害の遺伝子治療法。
12. HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス（HVJ）ーリボソームの形態にある、請求項 11 記載の治療法。
13. HGF 遺伝子を、エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に投与する、請求項 11 又は 12 記載の治療法。
- 25 14. HGF 遺伝子を少なくとも各週 1 回で 8 回投与する、請求項 11 ～ 13 のいずれか記載の治療法。
15. 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、請求項 11 ～ 14 のいずれか記載の治療法。

16. エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に障害の治療に有効な遺伝子を投与することを含む、遺伝子治療法。
17. 障害組織が心筋である、請求項 16 記載の治療法。
18. 遺伝子が HGF 遺伝子である、請求項 16 又は 17 記載の治療法。
- 5 19. 非侵襲的投与用心筋障害治療剤の製造のための HGF 遺伝子の使用。
20. HGF 遺伝子がセンダイ・ウイルス (HVJ) - リボソームの形態にある、請求項 19 記載の使用。
21. エコー使用下に障害心筋部位に非侵襲的に HGF 遺伝子を投与するための治療剤である、請求項 19 又は 20 記載の使用。
- 10 22. 心筋障害が心筋症、狭心症又は心不全である、請求項 19 ~ 21 のいずれか記載の使用。
23. エコー使用下に障害組織部位に非侵襲的に障害の治療に有効な遺伝子を投与するための遺伝子治療剤製造のための遺伝子の使用。
24. 障害組織が心筋である、請求項 23 記載の使用。
- 15 25. 遺伝子が HGF 遺伝子である、請求項 23 又は 24 記載の使用。



1/2

FIG. 1

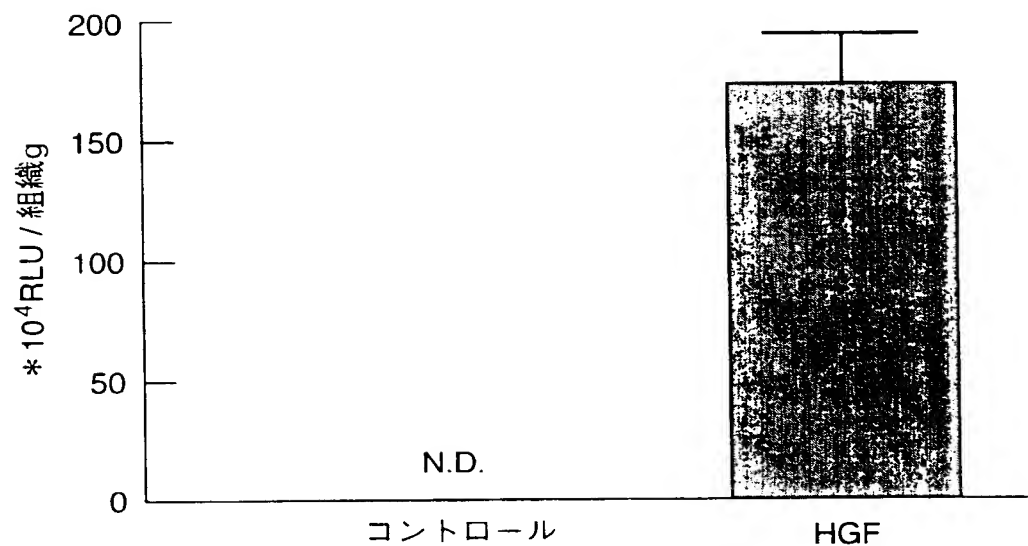
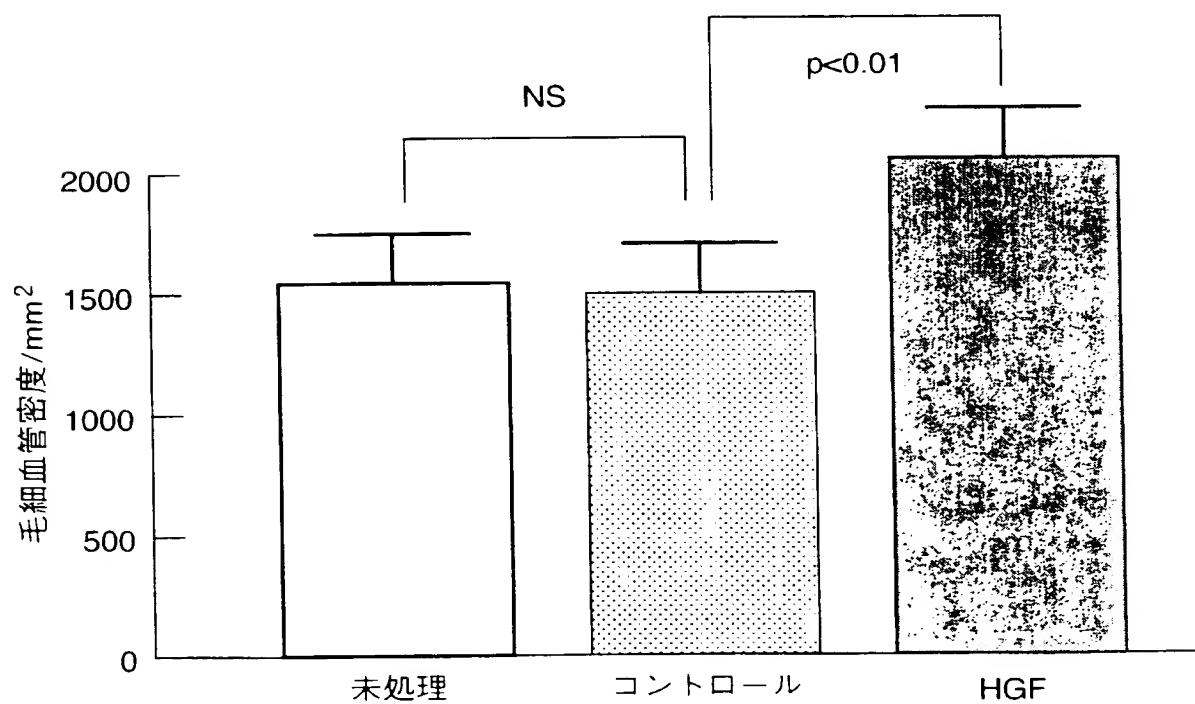


FIG. 2





2/2

FIG. 3

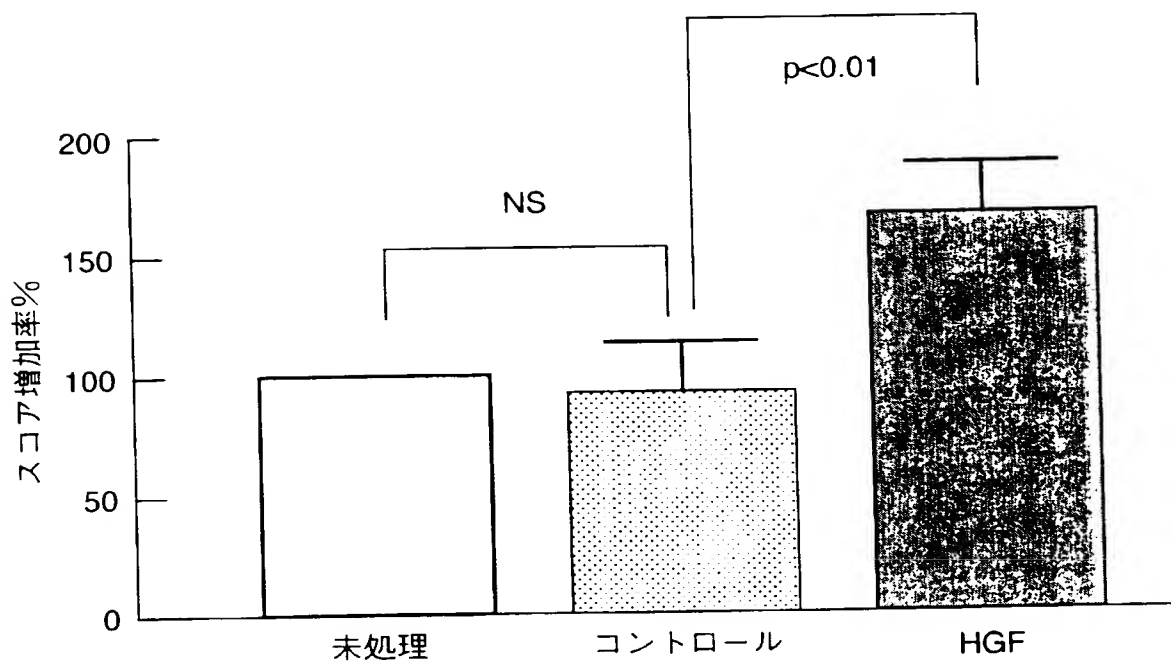
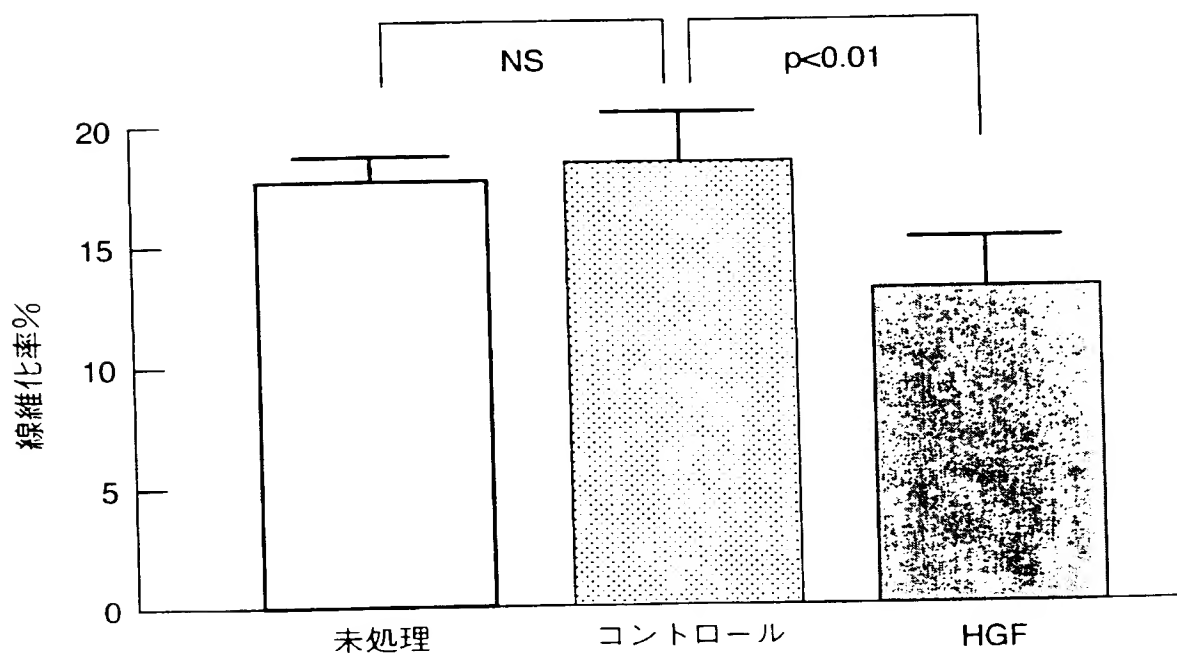


FIG. 4





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06947

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, A61P9/10, 9/04 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, A61P9/10, 9/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CA (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	ESAKOF D.D. et al., "Intraoperative multiplane transesophageal echocardiography for guiding direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor in patients with refractory angina pectoris", HUMAN GENE THERAPY, (1999) Vol.10, No.14, pp.2307-2314	8, 9, 23, 24 1-7, 10, 19-22, 25
Y	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, pp.1321	1-7, 10, 19-22, 25
Y	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol.90, pp.1937-1941	1-7, 10, 19-22, 25
Y	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol.97, pp.381-390	1-7, 10, 19-22, 25
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 December, 2000 (19.12.00)		Date of mailing of the international search report 26 December, 2000 (26.12.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06947

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 11-18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 11 to 18 pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 00/06947

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, A61P9/10, 9/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, A61P9/10, 9/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	ESAKOF D.D. et al., "Intraoperative multiplane transesophageal echocardiography for guiding direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor in patients with refractory angina pectoris", HUMAN GENE THERAPY, (1999) Vol. 10, No. 14, p. 2307-2314	8, 9, 23, 24 1-7, 10, 19-22, 25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.12.00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳子

印

4 P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, p.1321	1-7, 10, 19-22, 25
Y	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol. 90, p.1937-1941	1-7, 10, 19-22, 25
Y	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol. 97, p. 381-390	1-7, 10, 19-22, 25

第1欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲11-18は手術又は治療による人体の手術又は治療による処置方法及び診断方法であり、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 E 5 5 4 6 - 0 0	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 0 0 / 0 6 9 4 7	国際出願日 (日.月.年) 0 5 . 1 0 . 0 0	優先日 (日.月.年) 0 8 . 1 0 . 9 9
出願人(氏名又は名称) メドジーン バイオサイエンス株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☒ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 11-18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 11-18 は手術又は治療による人体の手術又は治療による処置方法及び診断方法であり、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, 9/10, 9/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K48/00, 38/22, 35/76, 9/127, 9/10, 9/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	ESAKOF D.D. et al., "Intraoperative multiplane transesophageal echocardiography for guiding direct myocardial gene transfer of vascular endothelial growth factor in patients with refractory angina pectoris", HUMAN GENE THERAPY, (1999) Vol. 10, No. 14, p. 2307-2314	8, 9, 23, 24 1-7, 10, 19-22, 25

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.12.00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

榎本 佳子

4 P

9638

電話番号 03-3581-1101 内線 3492



C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	AOKI, Motokuni et al., "Beneficial angiogenesis induced by over-expression of human hepatocyte growth factor (HGF) in non-infarcted and infarcted myocardium: Potential gene therapy for myocardial infarction", Circulation, (1998) Vol. 98, No. 17, p. I321	1-7, 10, 19-22, 25
Y	DERRICK S.G. et al., "Scatter factor induces blood vessel formation in vivo", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1993) Vol. 90, p. 1937-1941	1-7, 10, 19-22, 25
Y	ERIC Van Belle et al., "Potentiated Angiogenic Effect of Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor via Induction of Vascular Endothelial Growth Factor", Circulation, (1998) Vol. 97, p. 381-390	1-7, 10, 19-22, 25



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02359

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K48/00, A61K31/70, A61K9/127, A61K38/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K48/00, A61K31/70, A61K9/127, A61K38/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Pages Jean-Christophe "Efficient retroviral-mediated gene transfer into primary culture of murine and human hepatocytes: expression of the LDL receptor", Human Gene Therapy, Vol. 6, No. 1 (1995) P. 21-30	1 - 6
A	Atsuya Ozawa "Current Status and Future Trend of Gene Therapy", Ketsueki-Shuyo Ka (Blood and Tumor), Vol. 29, No. 3 (1994) P. 155-163	2
A	WO, 94/4171, A (Harvard College), March 3, 1994 (03. 03. 94) & JP, 8-504177 & EP, 671926, A	1, 2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 27, 1996 (27. 11. 96)

Date of mailing of the international search report

December 10, 1996 (10. 12. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/02359

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K48/00, A61K31/70, A61K9/127, A61K38/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁶ A61K48/00, A61K31/70, A61K9/127, A61K38/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Pages Jean-Christophe 「Efficient retroviral-mediated gene transfer into primary culture of murine and human hepatocytes: expression of the LDL receptor」、Human Gene Therapy, Vol. 6, No. 1 (1995) P. 21-30	1-6
A	小沢 敬也 「遺伝子治療の現状と将来」、血液・腫瘍科、Vol. 29, No. 3 (1994) P. 155-163	2
A	WO, 94/4171, A (Harvard College), 3. 3月. 1994 (03. 03. 94) & JP, 8-504177 & EP, 671926, A	1, 2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 96

国際調査報告の発送日

10.12.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

印

4C 9051

田村 聖子

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)

